

FAKTORY VIRULENCE A REZISTENCE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

DOMINIK MARŠÍK

Ústav biotechnologie, Vysoká škola chemicko-
technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
marsikd@vscht.cz

Došlo 2.2.21, přijato 30.8.21.

Klíčová slova: *Pseudomonas aeruginosa*, virulence, rezis-
tence, pseudomonádové infekce

Obsah

1. Úvod
2. Quorum sensing
 - 2.1. Systém *las* a *rhl*
 - 2.2. Systém *pqs*
 - 2.3. Systém *iqs*
3. Biofilm
4. Bičíky a pily
5. Sekrece proteinů
6. Chelatace iontů železa
7. Lipopolysacharidy
8. Rezistence
 - 8.1. Mechanismy přirozené rezistence
 - 8.2. Mechanismy získané rezistence
 - 8.3. Mechanismy adaptivní rezistence
 - 8.4. Epidemiologie
9. Závěr

1. Úvod

Pseudomonas aeruginosa (PA) je gramnegativní, heterotrofní, tyčinkovitá bakterie, kterou lze izolovat z vody a půdy, kde se mimo jiné podílí na biodegradaci polycyklických aromatických uhlovodíků¹. U člověka není přirozenou součástí střevní mikrobioty, nicméně se může vyskytovat v horních cestách dýchacích nebo na kůži². Jako oportunní patogen způsobuje akutní chronické infekce včetně pneumonie, meningitis, abscesu, infekce kůže, močových cest, kostí a kloubů, měkkých tkání a bakteriémií³. Riziko vzniku pseudomonádové infekce zvyšuje dlouhodobá hospitalizace pacientů, zavedení invazivního vstupu, užívání širokospektrých antibiotik, pokročilý věk pacienta a hospitalizace na oddělení JIP (jednotka intenzivní péče). Obzvláště ohroženou skupinou jsou chroničtí a imunokompromitovaní pacienti, mezi které patří diabetici, osoby s cystickou fibrózou (CF), onkologičtí pacienti, HIV pozitivní pacienti a lidé po transplantaci⁴.

Samotný průběh infekce závisí mimo zdravotního stavu pacienta také na virulenci a úrovni rezistence PA, které se napříč izoláty značně liší⁵.

2. Quorum sensing

Na bakterie lze nahlížet jako na velice společenské organismy, které jsou schopny vzájemné sociální interakce. Bakteriální komunikace probíhá pomocí jednoduchých a membránově difuzních signálních molekul uvolňovaných do bezprostředního okolí buňky. Tato forma komunikace se nazývá „quorum sensing“ (QS) a její efekt je podmíněn dosažením prahové koncentrace signálních molekul, které bakterie docílí až v populaci o vysoké hustotě. Aktivace regulačního mechanismu QS ovlivňuje genovou expresi a tvorbu určitého fenotypu, které jsou klíčové pro schopnost bakterie prospívat v konkurenčním prostředí, modulaci produkce faktorů virulence a adaptaci na metabolické požadavky života v komunitě^{3,6,7}. Celkově je systémem QS regulováno téměř 10 % genomu PA^{8,9}.

PA disponuje čtyřmi hierarchicky propojenými systémy QS pro mezidruhovou komunikaci, a to *las*, *rhl*, *pqs* a *iqs*, přičemž systém *las* je ostatním systémům nadřazený. Hierarchie systémů je však do jisté míry variabilní a v závislosti na stresu a podmínkách prostředí dochází k jejímu uzpůsobení. QS systémy regulují tvorbu biofilmu a genovou expresi faktorů virulence včetně elastasy, exotoxinu A, pyocyaninu, lipasy, pyoverdinu a lektinů⁶.

2.1. Systém *las* a *rhl*

Signální kaskády *las* a *rhl* jsou obdobné a komunikaci v těchto systémech zprostředkovávají acyl-homoserinové laktony, konkrétně 3-oxo-*N*-[(3*S*)-tetrahydro-2-oxo-3-furanyl]-dodekanamid (OdDHL) v řídicím systému *las* a *N*-[(3*S*)-2-oxoxolan-3-yl]butanamid (BHL) v systému *rhl*. Obecně jsou OdDHL a BHL označovány jako autoinduktory, protože po vazbě s příslušnými receptorovými proteiny LasR a RhlR iniciují produkci vlastních synthas – LasI a RhlI. Komplexy LasR-OdDHL a RhlR-BHL se následně pojí s konzervativními *las-rhl* boxy umístěnými v promotorech cílových genů, čímž zahajují jejich expresi. Některé geny jsou dobře aktivovány oběma komplexy, u některých je ale k transkripci vyžadován signál pouze jednoho z nich^{9,10}.

Komplex LasR-OdDHL mimo jiné indukuje produkci RsaL, který působí jako transkripční represor obousměrného promotoru *rsal-lasI*. Vazba RsaL na promotor *rsal-lasI* inhibuje expresi obou genů, čímž je potlačena pozitivní zpětnovazebná regulace a dochází k ustálení hladiny OdDHL. V případě současné vazby komplexu LasR-OdDHL s RsaL na promotor převažuje aktivita represoru nad funkcí akti-

vátoru. Mimo další regulační proteiny *las* a *rhl* systému, využívá PA k vyrovnání hladiny acyl-homoserinových laktonů „quorum quenching“ enzymy, které degradují autoinduktory přímo. Termín „quorum quenching“ je obecně užíván pro strategie potlačující systém quorum sensing^{9,10}.

2.2. Systém *pqs*

Mezibuněčná komunikace *pqs* systému je založena na chinolonu, konkrétně na 2-heptyl-3-hydroxychinolin-4-(1*H*)-onu pojmenovaném jako „pseudomonas quinole signal“ (PQS). Krátce po interakci PQS s receptorem PqsR je zahájena regulace systému. První krok biosyntézy PQS iniciuje PqsA neboli anthranilát-CoA-ligasa, která aktivuje anthranilát za vzniku anthraniloyl-CoA. Přeměnu anthranilátu začleněním kyseliny 3-oxodekanové na 2-heptylchinolin-4(1*H*)-on (HHQ) zprostředkovávají 3-oxoacyl-(acyl přenášející protein)-synthasy. Následným působením PqsH neboli flavin-dependentní monooxygenasy dochází k hydroxylaci HHQ v poloze 3 a tím k završení biosyntézy PQS, který indukce expresi *pqsABCDE*. Expresi může zahájit rovněž HHQ, ale s přibližně 100krát menší účinností než PQS (cit.⁹).

2.3. Systém *iqs*

Poslední z dosud popsáných QS komunikačních systémů PA je IQS (integrováný „quorum sensing“ signál). Bakterie může tento systém využít k částečnému nahrazení hlavního systému *las* za stresových podmínek, kterým je vystavena v průběhu infekce, například z důvodu nedostatečného množství fosfátů. Signální molekulou systému je 2-(2'-hydroxyfenyl)-thiazol-4-karbaldehyd⁹, vedlejší produkt biosyntézy nebo degradace sideroforu pyochelinu¹¹.

3. Biofilm

PA disponuje dvěma módy způsobu růstu, a to planktonní růst nebo povrchově vázaný růst v biofilmu. Být součástí biofilmu poskytuje bakterii benefity mnohobuněčného způsobu života a umožňuje mikroorganismu kolonizovat různá prostředí či překonat řadu stresových podmínek. Oproti planktonním buňkám zvyšuje pobyt bakterie v komunitě šance na přežití při nedostatku živin, dehydrataci, změně pH nebo při napadení bakteriofágy. Během infekce jsou buňky biofilmu chráněny proti imunitnímu systému hostitele a před působením antibakteriálních látek včetně biocidů, oxidačních látek a antibiotik¹².

Odolnost proti působení antimikrobiálních látek v biofilmu je zajištěna kombinací několika faktorů včetně zpomaleného růstu, přítomností perzistentních buněk, zvýšené produkce „efluxních pump“ a omezenou penetrací antimikrobiálních látek skrz extracelulární matrix obsahující vodu a extracelulární polymerní substanci (EPS)¹². EPS zaujímá 50 až 90 % celkové organické hmoty biofilmu a obsahuje polysacharidy, proteiny, glykoproteiny, lipidy, extracelulární nukleové kyseliny a huminové lát-

ky¹³. V matrix biofilmu se také mohou hromadit extracelulární enzymy inaktivující antibiotika jako například sekretované β-laktamasy. Odolnosti přispívá i rozdílná metabolická aktivita buněk biofilmu. Účinek některých antibiotik, jako většiny laktamů a aminoglykosidů, je spojen s růstem bakterií, zatímco polymyxiny jsou účinnější proti pomalu rostoucím bakteriím¹⁴. Buňky vnější vrstvy biofilmu, které mají přístup k živinám, jsou metabolicky aktivní, zatímco buňky ve vnitřní vrstvě mají metabolickou aktivitu utlumenou. Uvádí se, že bakteriální buňky biofilmu jsou ve srovnání s planktonní formou vůči antibiotikům 1000krát až 3000krát odolnější⁶.

4. Bičíky a pili

Pili a bičíky jsou důležité nejenom pro pohyb, ale také hrají roli při rozvoji infekce. Monotrichální bičík PA je nezbytnou součástí chemotaxe, iniciuje zánětlivou reakci a může zprostředkovat počáteční interakci s membránami epitelálních buněk^{3,15}. Pili zprostředkovávají samotnou adhezi k buňkám epitelu, ale i k dalším povrchům a jejich vazba je považována za klíčový krok pro vznik biofilmu^{1,3}.

5. Sekrece proteinů

Závažnost samotné infekce PA je v přímém vztahu se sekrecí exoenzymů, které způsobují poškození tkáně hostitele a umožňují invazi, šíření a rozvoj chronické infekce³. Celkově bylo v PA identifikováno pět systémů sekrece proteinů (typ I, II, III, V a VI)¹, typ IV se v PA nenachází¹⁶.

Sekrečním typem I (T1SS) je u PA produkována alkalická proteasa AprA a protein HasAp. AprA je jako většina sekretovaných proteas faktorem virulence. Protein HasAp váže hem z hemoglobinu, čímž bakterie překonává velmi nízkou koncentraci iontů železa v hostiteli. V této souvislosti je HasAp pravděpodobně klíčovou složkou přežití PA v raných stádiích infekce¹⁷.

Sekreční typ II (T2SS), rovněž označovaný jako obecná sekreční dráha, zajišťuje translokaci velkých exoproteinů připravených v periplasmě přes vnější bakteriální membránu¹. Mezi vylučovanými proteiny jsou hydrolytické enzymy jako pseudolysin, Las elastasy, proteasa IV, alkalická proteasa, fosfolipasa H, lipolytické enzymy a exotoxin A. LasB degraduje kolagenní a nekolagenní proteiny hostitele, narušením fyzických bariér umožňuje šíření infekce a inhibuje chemotaxi monocytů, čímž se PA brání fagocytóze a prezentaci bakteriálních antigenů hostitelskému imunitnímu systému. Proteasa typu IV chrání PA během infekce degradací hostitelských povrchově aktivních proteinů A a D, čímž inhibuje asociaci bakterie s alveolárními makrofágy a rovněž může degradovat imunoregulační proteiny včetně komplementu, imunoglobulinů, fibrinogenu, plasminogenu a antibakteriálních peptidů³. Alkalická proteasa degraduje proteiny komplementu hostitele, fibronektin a bakteriální monomer flagelinu, který následně nemůže být rozeznán toll-like receptorem 5

(TLR5) a PA tak neaktivuje vrozený imunitní systém hostitele¹⁸. Fosfolipasa H a lipolytické enzymy štěpí povrchově aktivní lipidy a fosfolipidy membrán hostitelských buněk, čímž dochází k zvýšení povrchového napětí, které může vyústit až k lyzi např. erytrocytů. Exotoxin A inaktivuje elongační faktor 2, čímž je přerušena proteosyntéza a nastává smrt napadených buněk^{19,20}.

Sekreční typ III (T3SS) je zabudovaný ve dvojité membráně PA a řídí vstříkávání efektorových proteinů přímo do cytosolu nebo membrány hostitelských buněk, čímž podporuje bakteriální invazi a kolonizaci. Tento systém je rovněž určující faktor virulence, který je v přímém vztahu s akutními infekcemi a zvýšenou mortalitou. V závislosti na kmenu byly v PA identifikovány čtyři klíčové efekторы (ExoU, ExoT, ExoS a ExoY), které mohou po vstříknutí způsobit rychlou smrt hostitelské buňky^{1,3}. Role v patogenitě T3SS není přesně známá, znesnadňuje však hojení ran, čímž usnadňuje invazi a šíření PA. Efektor ExoU je vysoce účinná fosfolipasa způsobující do 1 až 2 hodin rychlou nekrotickou smrt eukaryotních buněk v důsledku nevratného poškození biologických membrán. ExoT je bifunkční toxin složený z GAP proteinu stimulujícího aktivitu GTPasy G proteinu a ADPRT neboli ADP-ribosyltransferasy, jejímž vlivem dochází k buněčné smrti podobné apoptóze. Společnou aktivitou GAP a ADPRT dochází ke změně cytoskeletárního aktinu, blokaci buněčného dělení ve fázi cytokinese a inhibici migrace, adheze a proliferace buněk, což způsobuje blokaci fagocytózy a narušení epiteliálních bariér pro snazší šíření infekce. ExoS je rovněž bifunkční toxin s GAP a ADPRT aktivitou. Účinek ADPRT způsobuje nekrózu a apoptózu hostitelských buněk, narušuje aktin cytoskeletu, čímž je usnadněn průnik PA skrz bariéry epitelu, inhibuje syntézu DNA, vezikulární transport a endocytózu. V porovnání s ExoT nastává při působení efektoru ExoS buněčná smrt výrazně rychleji. Poslední ze 4 zmíněných efektorů ExoY je adenylylcyklasa obsahující dvě domény, které vážou ATP. Po injekci ExoY do savčích buněk dochází ke zvýšení intracelulární koncentrace cAMP, což má za následek narušení aktinu cytoskeletu, inhibici příjmu bakterií hostitelskými buňkami a zvýšení permeability endotelu³.

Sekreční typ V (T5SS), známý také jako autotransportní systém, slouží k uvolnění faktorů virulence zacílených proti eukaryotním buňkám a podílí se na adhezenci buněk a tvorbě biofilmu. Prostřednictvím tohoto systému je u PA produkována lipasa ze skupiny proteinů podobných patatinu, která degraduje membrány hostitelských buněk a může iniciovat infekci. T5SS systém působí rovněž proti konkurenčním druhům bakterií prostřednictvím inhibice růstu podmíněné kontaktem²¹.

Poslední sekreční typ VI (T6SS) využívá k distribuci efektorů mechanismus podobající se kontraktilnímu bičíku bakteriofága, jehož hrot napomáhá penetraci membrán cílových buněk²². T6SS obsahuje široký repertoár antibakteriálních efektorů, které poskytují PA výhodu v rámci vnitrodruhové a mezidruhové kompetice. I když je podpora adaptace a přežití v odlišných bakteriálních společenstvích pravděpodobně primární funkcí systému, T6SS se podílí rovněž na infekci eukaryot a efekторы PldA, PldB

nebo TplE účinkují jak na prokaryotické, tak eukaryotické buňky²³.

6. Chelatace iontů železa

Jako většina organismů vyžaduje i PA pro svůj růst ionty železa. Využívá k tomu různé strategie, jejichž aplikace je závislá na typu infekce. Jednou z možností získu iontů železa je produkce sideroforů pyoverdinu a pyochelinu, které specificky chelatují Fe^{3+} ionty. Pyoverdin je kromě sideroforu navíc signální molekulou, protože spouští produkci dvou efektorů, konkrétně proteasy PrpL a exotoxinu A. Jeho produkce je tak pravděpodobně nezbytná k rozvoji akutní infekce a podporuje tvorbu silných a zralých biofilmů. Druhý ze sideroforů, tedy pyochelin, má oproti pyoverdinu výrazně nižší afinitu k iontům železa. Chelataci iontů železa zahajuje PA nejprve produkcí pyochelinu a až když je koncentrace těchto iontů skutečně nízká, přechází na produkci pyoverdinu. Opakovaná oxidace a redukce v komplexu pyochelin-železo způsobuje oxidační poškození a zánět. Rozsah poškození závisí na přítomnosti další extracelulární prozánětlivé sloučeniny pyocyaninu. U chronických infekcí se pyochelin podílí na rozvoji přetrvávajícího zánětu. Alternativně se může PA uchýlit k „pirátství sideroforů“ a využít siderofory jiných mikroorganismů²⁴.

Zdrojem iontů železa může být pro PA také prostetická skupina hemoproteinů hem, z které jsou ionty odčerpány prostřednictvím systému Has a Phu. Hem se v organismu nenachází volně, protože je vysoce hydrofobní, díky čemuž se sdružuje s membránami, kde podporuje neenzymové redoxní reakce. Hem proto musí být z hemoproteinů nejprve extrahován. V případě Phu systému dochází k extrakci přímo receptorem PhuR umístěným na vnější membráně, zatímco systémem Has je hem z hemoproteinů extrahován vylučovaným hemoferem HasA a vzniklý komplex HasA-hem je následně rozpoznán receptorem HasR²⁴.

V mikroaerobním nebo anaerobním prostředí, kterému je PA vystavena například v plicním sputu u pacientů s CF, kde vytváří biofilm, vyžaduje bakterie transport zde stabilních a převažujících Fe^{2+} iontů. Ty pravděpodobně difundují vnější membránou a do cytoplasmy jsou transportovány FeOABC systémem. Samotnou absorpci iontů železa v biofilmech umožňují fenazinové sloučeniny pyocyanin a jeho prekurzor kyselina fenazin-1-karboxylová, které redukují Fe^{3+} vázaný na hostitelské proteiny²⁴. Pyocyanin navíc způsobuje v respiračním traktu ciliární dysfunkci, působí prozánětlivě, poškozuje katalasu a mitochondriální transport elektronů a chrání PA před reaktivními formami kyslíku a dusíku produkovanými fagocytujícími buňkami během infekce³.

7. Lipopolysacharidy

Lipopolysacharidy (LPS) jsou důležitou součástí vnější membrány gramnegativních bakterií včetně PA.

Podílí se na antigenicitě, vzniku zánětlivé reakce, transportu molekul do vnějšího prostředí, zprostředkovávají interakci s antibiotiky a tvoří konstrukční složku biofilmu, kde se podílí na bakteriální adhezi, adherenci a viskoelasticitě. Mimoto zvyšují negativní náboj buňky, čímž přispívají ke strukturální integritě a chrání membránu před účinkem různých chemikálií. LPS jsou tvořeny třemi typickými doménami – lipidem A zakotveným v membráně, jádrem LPS a specifickým O-antigenem. Obecně se jedná o významný faktor bakteriální patogenity a imunitní odpovědi hostitele, jehož účinek závisí na citlivosti pacienta a struktuře³.

Lipid A je složen z *N*- a *O*-acylovaného diglukosaminodifosfátu [4- β -D-GlcpN^{II}-(1 \rightarrow 6)- α -D-GlcpN^I-(1 \rightarrow P)] s variabilním počtem primárních acylových skupin a typem mastných kyselin substituujících primární a sekundární acylové skupiny. Počet, poloha a povaha vázaných acylových skupin se může lišit v závislosti na kmenu, zdroji izolace a podmínkách růstu bakterie. Lipid A zodpovídá v LPS za toxicitu. Jeho modifikace může pozměnit některé vlastnosti bakteriální patogenity jako citlivost k polymyxinům, kationtovým antimikrobiálním peptidům nebo zánětlivé vlastnosti, které ovlivňují průběh infekce³. Hostitel se účinkům lipidu A brání jeho rozpoznáním pomocí komplexu TLR-4 složeného z TLR-4 receptoru a dvou koreceptorů MD2 a CD14 (cit.²⁵). Lipid A připojený k CD14 může v přítomnosti kofaktoru MD2 interagovat s doménami TLR-4, čímž dochází k aktivaci transkripčních faktorů, zejména pak NF- κ B, který prostupuje do jádra a podporuje produkci prozánětlivých cytokinů, jako jsou interleukiny IL-1, IL-6, IL-8 a tumor nekrotizující faktor α , jejichž produkce může vyústit až v endotoxický šok. Odezva zprostředkovaná TLR-4 je silně závislá na stupni acylace lipidu A. Obecně je plně hexa-acylovaný lipid A spojen se silnější zánětlivou reakcí, zatímco nižší hladina acylace snižuje buněčnou odpověď a produkci prozánětlivých cytokinů³.

Oligosacharidové jádro je rozděleno na vnitřní a vnější a propojuje lipid A s O-antigenem. Vnitřní jádro PA obsahuje 3-deoxy-D-manno-okt-2-ulosonovou kyselinu kovalentně připojenou k několika zbytkům L-glycero-D-manno-heptosy. Vnější jádro je složeno z galaktosaminu, glukosy a rhamnosy. Sacharidy tvořící jádro jsou silně fosforylovány. Negativní náboj fosfátů stabilizuje membránu prostřednictvím interakce s dvojmocnými kationty²⁶.

Vnější část LPS tvoří variabilní polysacharidová doména označovaná jako O-antigen, která určuje antigenní specifitu a sérotyp PA. Syntéza O-antigeny probíhá odděleně od jádra spojeného s lipidem A a ke komplexu je připojen až později. Z tohoto důvodu nemusí každá molekula LPS obsahovat O-antigen, oba typy LPS jsou však exportovány na povrch bakterie. Vysoká variabilita O-antigeny může být využita k vnitrodruhové klasifikaci neboli O-sérotypizaci. Heterogenita O-antigeny je způsobena rozdílem v opakujících se cukerných jednotkách, vazbách mezi nimi nebo přítomností postranního řetězce. PA může současně produkovat dva typy O-antigeny, a to běžný polysacharidový antigen (CPA) a O-specifický antigen (OSA). CPA obsahuje konzervativní homopolymer sestávající z \rightarrow 3)D-Rha(α 1 \rightarrow 3)D-Rha(α 1 \rightarrow 2)D-Rha(α 1 \rightarrow

o obvyklé délce 70 jednotek, zatímco OSA je variabilní, stimuluje silnou imunitní odpověď a může být využit k segregaci PA pomocí O-specifických protilátek do mnoha skupin²⁶. Na základě O-sérotypizace bylo identifikováno nejméně 20 hlavních sérotypů (O1 až O20)¹.

8. Rezistence

Rezistence je dle Magiorakose a spol.²⁷ rozdělena na tři úrovně, a to multirezistenci (MDR), při které je bakteriální kmen necitlivý alespoň k jedné látce ze tří různých skupin antibiotik, extenzivní rezistenci (XDR), u které je izolát necitlivý alespoň k jedné látce téměř ze všech antibiotických skupin s výjimkou dvou, které zůstávají v citlivé kategorii, a panrezistenci (PDR), kterou popisuje jako necitlivost ke všem antibiotikům ze všech skupin. Díky přirozeným, získaným a adaptivním mechanismům rezistence může PA nepřetržitě zvyšovat svoji odolnost a bránit se působení antimikrobiálních látek vyvíjejících selekční tlak na vznik rezistence¹⁴.

8.1. Mechanismy přirozené rezistence

Divoké kmeny PA jsou v porovnání s ostatními kmeny gramnegativních bakterií přirozeně méně citlivé k většině antibiotik. Vděčí za to především nízké propustnosti vnější membrány, která působí jako selektivní bariéra absorpce antibiotik a jejíž propustnost je například ve srovnání s *E. coli* 12–100krát nižší¹⁴. Ve vnější membráně jsou vmezeřeny porinové kanály OprF, které jsou příčinou velkého vylučovacího limitu PA pro hydrofilní látky, ale při transportu antibiotik jsou neúčinné^{28,29}. Další porinové kanály, jako OprD a OprB, umožňují transport malých molekul zhruba o velikosti antibiotik. Alternativně mohou být antibiotika absorbována prostřednictvím specifických porinů¹⁴, samovolným příjmem po expozici polykationtovým antibiotikům³⁰ nebo příjmem hydrofobních molekul skrz dvojvrstvu vnější membrány³¹.

I přes nízkou permeabilitu vnější membrány, která se výrazně podílí na snížení příjmu antibiotika patogenem, dochází k ustálení rovnováhy hydrofilních látek na obou stranách membrány v řádu několika sekund. Proto je účinnost přirozené rezistence závislá na dalších přirozených nebo adaptivních mechanismech rezistence využívajících sníženého průchodu antibiotika skrz vnější membránu, jako produkce AmpC β -laktamasy způsobující enzymovou inaktivaci řady β -laktamů. Rychlost odtoku se odvíjí od míry přirozené nebo indukované produkce „efluxních pump“, zejména skupiny RND (resistance-nodulation-cell division)¹⁴. U PA bylo celkově identifikováno 12 RND „efluxních pump“, z nichž nejlépe je charakterizovaný systém MexAB-OprM, který se podílí na vysoké antimikrobiální rezistenci biofilmu¹.

8.2. Mechanismy získané rezistence

Jednou z možností vzniku získané rezistence je horizontální přenos genů. U horizontálního přenosu rozlišuje-

me tři základní mechanismy, jimiž mohou být z okolí přijaty úseky DNA obsahující informaci o rezistenci – konjugace, transformace a transdukce. Přenesenými úseky, které mohou rezistenci kódovat, jsou například plasmidy, transpozomy, integrony nebo profágy. U PA ovlivňuje horizontální přenos zejména rezistenci k aminoglykosidům a β -laktamům. Jako příklad lze uvést přenos genu kódujícího produkci enzymu, jehož účinkem dochází k chemické modifikaci struktury aminoglykosidu, čímž je snížena jeho afinita k 30S ribosomální podjednotce. Prostřednictvím plasmidu může PA rovněž rozšířit své přirozené enzymové vybavení zahrnující β -laktamasu AmpC o další enzymy hydrolyzující β -laktamový kruh penicilinů a cefalosporinů. Velmi znepokojujícím jevem je šíření plasmidů kódujících širokospektré β -laktamasy (ESBL) a metallo- β -laktamasy (MBL) se schopností inaktivovat karbapenemy¹⁴.

Dalším typem získané rezistence je modifikace chromosomální genetické informace. Frekvence vzniku spontánních mutací se u jednotlivých typů antibiotik liší a za určitých podmínek, například v přítomnosti mutagenu nebo během růstu bakterie v biofilmu, může dojít ke zvýšení mutační rychlosti¹⁴. U PA vystavené působení ciprofloxacinu bylo při růstu v biofilmu ve srovnání s planktonními buňkami pozorováno až stopětinásobné zvýšení frekvence vzniku mutace vedoucí k rezistenci. Ke zvýšení mutability v biofilmu dochází pravděpodobně z důvodu úbytku antioxidantních enzymů při tomto typu růstu, což má za následek častější poškození DNA (cit³²). U hypermutabilních kmenů s mutacemi v genech zapojených do oprav chyb při replikaci dochází ke zvýšení frekvence vzniku mutace až 70krát. U takových bakterií může vzniknout rezistence na několik různých antibiotik. Mezi silné hypermutátory patří kmeny s mutacemi v mutátorových genech *mutL* a *mutS*, které jsou běžně identifikovány u pacientů s CF (cit¹⁴).

Mezi mutace, které činí infekce PA jen obtížně léčitelné, patří ty, které vedou k nadměrné produkci „efluxních pump“, sníženému příjmu antibiotik, hyperprodukcí β -laktamas a strukturálním změnám antibiotického cíle. Velmi důležitým mechanismem je například mutace vedoucí k opětovné produkci „efluxních pump“ MexAB-OprM a MexCD-OprJ a nadměrné produkci MexXY-OprM, která u klinických izolátů PA zajišťuje rezistenci k aminoglykosidům, fluorochinolonům a cefepimu. Mezi další klinicky významné mutace patří ty, které vedou ke strukturální změně OprD a snižují tak příjem imipenemu nebo ty, v jejichž důsledku dochází ke snížení produkce tohoto porinu a současně zvyšují produkci „efluxní pumpy“ MexEF-OprN. Takové změny mohou vést až k mnohočetným rezistencím. K hyperprodukcí β -laktamas dochází zvýšením exprese genu *ampC* v důsledku snížení produkce nebo mutace efektoru AmpD. Ke klinicky významným mutacím patří dále ty, které vedou přímo ke strukturální změně enzymu. Jako příklad lze uvést mutace gyrasy nebo topoisomerasy IV, které snižují vazebnou afinitu k fluorochinolonům¹⁴.

8.3. Mechanismy adaptivní rezistence

Adaptivní rezistence je indukovatelný proces, při kterém dochází v přítomnosti subinhibiční koncentrace antibiotika ke změnám v genové expresi a po odstranění induktoru se buňka vrací zpět do původního stavu. Tento typ rezistence je závislý na růstovém stádiu bakterie a úrovni fyzikálního nebo chemického stresu³³. Induktorem tohoto typu rezistence mohou být kromě antibiotik také biocidní látky, polyaminy, pH, anaerobióza, kationty, různé zdroje uhlíku nebo tvorba biofilmu. Zmíněné faktory modulují expresi mnoha genů, které mají přímý účinek na „efluxní pumpy“, buněčný obal a produkci bakteriálních enzymů¹⁴.

U PA je adaptivní rezistence obzvlášť významná z důvodů širokého zastoupení regulačních genů, které tvoří 9,4 % z celkového genomu, a také proto, že v klinickém prostředí roste ve formě biofilmu. Pokud nedojde při léčbě ke kompletnímu vymýcení bakterie, můžeme po zastavení léčby pozorovat opětovný růst s dlouhodobými klinickými důsledky¹⁴.

Zásadním adaptivním mechanismem PA je indukce β -laktamasy kódované genem *ampC*. U antibiotik jako cefotaxim nebo ceftazidim může dojít z důvodů zvýšené exprese tohoto genu ke klinickému selhání. Naopak zástupci čtvrté generace cefalosporinů cefepim a cefripom *ampC* gen vůbec neaktivují nebo pouze slabě¹⁴.

Další mechanismus vycházející ze subinhibiční koncentrace antibiotika je nadměrná exprese genů kódujících „efluxní pumpy“. Například aminoglykosidy indukují produkci „efluxní pumpy“ MexXY. Prostřednictvím této regulační změny dochází k rychlejšímu vyloučení antibiotika a bakterie se stává adaptivně rezistentní. Nadměrná produkce „efluxních pump“ může vést až k MDR (cit.¹⁴).

K rozvoji rezistence dochází i v případě samovolně přijímaných polykationtových antimikrobiálních látek, mezi které patří aminoglykosidy, polymyxiny a kationtové antimikrobiální peptidy. Tyto látky kompetitivně vytěsňují dvojmocné kationty z vazby na LPS, což má za následek lokální desorganizaci membrány a průchod polykationtů do periplasmu^{14,30}. Rezistence PA k tomuto typu látek je asociovaná s kovalentním připojením 4-amino-L-arabiny k LPS, konkrétně k fosfátu lipidu A a ke zbytku 3-deoxy-D-manno-okt-2-uloseonové kyseliny v oblasti vnitřního jádra^{34–36}. Tato modifikace je kódována geny operonu *arnBCADTEFpmrE* a pravděpodobně brání interakci mezi náboji fosfátových skupin LPS a aminoskupin polykationtových antimikrobiálních látek. Spouštěčem *arn* operonu může být nízká koncentrace dvojmocných kationtů nebo expozice polymyxinům či antimikrobiálním peptidům^{14,34}. K indukci může dojít rovněž v biofilmech, ve kterých extracelulární DNA brání přístupu kationtů³⁷.

8.4. Epidemiologie

Prevalence multirezistentních kmenů PA (se značnými geografickými rozdíly) celosvětově roste. V některých oblastech se pohybuje v rozmezí 15 až 30 % a významná

část těchto kmenů splňuje až kritéria pro klasifikaci XDR. Genotyp MDR/XDR kmenů PA je ve srovnání s citlivými kmeny konzervativní a globálně jsou rozšířeny převážně 3 rizikové klony – ST175, ST111 a ST235. Většina izolátů PA produkujících horizontálně získané ESBL nebo MBL jsou klony ST235 a ST111 (cit⁵). Analýza genomu ST235 naznačuje, že přítomnost specifické DNA ochranného proteinu DprA, který interaguje s rekombinací RecA za účelem integrace přijaté DNA do hostitelského chromosomu, pravděpodobně zvyšuje schopnost získat a zachovat si přijaté prvky rezistence ve srovnání s ostatními klony PA (cit.³⁸).

9. Závěr

Rozsáhlý genom obsahující řadu faktorů virulence v kombinaci s komplexním mechanismem nabytí rezistence činí z PA jednu z nejobávanějších bakterií ohrožujících lidské zdraví. To dokládá i uvedení PA rezistentní ke karbanemům na seznam mikroorganismů WHO z roku 2017, proti kterým je nezbytně nutné vyvinout nová antibiotika^{1,5}. Mimo rozsáhlý výzkum v oblasti vývoje antimikrobiálních látek je urgentní potřeba alternativního přístupu k léčbě, zejména takového, který by nevyvíjel selekční tlak na vznik rezistence. Velice slibnou strategií je inhibice regulačního mechanismu QS, díky které by došlo k potlačení patogenity bez bakteriostatického nebo bakteriocidního účinku^{6,7}. Vzhledem k celosvětově rostoucímu výskytu MDR/XDR kmenů PA je potřeba při podezření na pseudomonádovou infekci neprodleně provést typizaci zahrnující stanovení citlivosti na antibiotika a detekovat mobilní genetické elementy kódující antibiotické rezistence. Takové testy by měly být prováděny rovněž z preventivních důvodů jako součást rutinní kontroly epidemiologických ohnisek v nemocničním prostředí⁴.

Tento výstup vznikl v rámci projektu Specifického vysokoškolského výzkumu – projekt č. A2_FPBT_2021_029.

Seznam zkratek

30S	malá podjednotka ribosomu
ADPRT	ADP-ribosyltransferasa (ADP-ribosyltransferase)
AmpC	β-laktamasa třídy C (class C β-lactamase)
ATP	adenosintrifosfát (adenosine triphosphate)
BHL	<i>N</i> -[(3 <i>S</i>)-2-oxooxolan-3-yl]butanamid (<i>N</i> -butyryl-homoserine lactone)
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát (cyclic adenosine monophosphate)
CD14	diferenciační skupina 14 (cluster of differentiation 14)
CF	cystická fibróza (cystic fibrosis)
CPA	běžný polysacharidový antigen (common polysaccharide antigen)
DprA	protein A zpracovávající DNA (DNA processing protein A)

EPS	extracelulární polymerní substance (extracellular polymeric substance)
ESBL	širokospektré β-laktamasy (extended spectrum β-lactamases)
FeOABC	transportní systém železa (ferrous transporter system)
GAP	protein aktivující GTPasu (GTPase activating protein)
Has	systém asimilace hemu (heme assimilation system)
HHQ	2-heptylchinolin-4(1 <i>H</i>)-on (2-heptyl-4-quinolone)
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti (human immunodeficiency virus)
IL	interleukin
IQS	integrováný „quorum sensing“ (integrated quorum sensing)
JIP	jednotka intenzivní péče
LPS	lipopolysacharidy (lipopolysaccharides)
MBL	metalo-β-laktamasy (metallo-β-lactamases)
MD2	myeloidní diferenační faktor 2 (myeloid differentiation factor 2)
MDR	multirezistence (multidrug resistance)
NF-κB	jaderný faktor kappa B (nuclear factor kappa B)
O1-O20	označení sérotypu
OdDHL	3-oxo- <i>N</i> -[(3 <i>S</i>)-tetrahydro-2-oxo-3-furanyl]-dodekanamid (<i>N</i> -3-oxododecanoyl-homoserine lactone)
Opr	proteiny vnější membrány (outer membrane proteins)
OSA	O-specifický antigen (O-specific antigen)
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PDR	panrezistence (pandrug resistance)
Phu	systém pseudomonad pro utilizaci hemu (pseudomonas heme utilization)
PQS	pseudomonádový chinolonový signál (pseudomonas quinole signal)
QS	quorum sensing
RecA	rekombinasa A (recombinase A)
RND	typ „efluxních pump“ (resistance-nodulation-cell division)
ST	kmen (strain)
TLR	receptory podobné toll (toll-like receptor)
TnSS	sekreční typ n (type n secretion system)
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)
XDR	extenzivní rezistence (extensive drug resistance)

LITERATURA

- Diggle S. P., Whiteley M.: *Microbiology* 166, 30 (2020).
- Oliver A., Mulet X., López-Causapé C., Juan C.: *Drug Resist. Updat.* 21, 41 (2015).
- Al-Wrafiy F., Brzozowska E., Górska S., Gamian A.: *Postępy. Hig. Med. Dosw.* 70, 78 (2016).
- Bassetti M., Vena A., Croxatto A., Righi E., Guery B.: *Drugs Context* 7, 212527 (2018).
- Horcajada J. P., Montero M., Oliver A., Sorlí L.,

- Luque S., Gómez-Zorrilla S., Benito N., Grau S.: *Clin. Microbiol. Rev.* 32, e00031-19 (2019).
6. Tommonaro G. (ed.): *Quorum sensing molecular mechanism and biotechnological application*. Academic Press, London 2019.
 7. Whiteley M., Diggle S. P., Greenberg E. P.: *Nature* 551, 313 (2017).
 8. Deep A., Chaudhary U., Gupta V.: *J. Lab. Physicians* 3, 4 (2011).
 9. Lee J., Zhang L.: *Protein Cell* 6, 26 (2015).
 10. Badawy M. S. E. M., Riad O. K. M., Taher F. A., Zaki S. A.: *Int. J. Biol. Macromol.* 149, 1109 (2020).
 11. Cornelis P.: *MicrobiologyOpen* 9, e962 (2020).
 12. Rumbaugh K. P., Sauer K.: *Nat. Rev. Microbiol.* 18, 571 (2020).
 13. Brindhadevi K., Lewis-Oscar F., Mylonakis E., Shanmugam S., Verma T. N., Pugazhendhi A.: *Process Biochem.* 96, 49 (2020).
 14. Breidenstein E. B. M., de la Fuente-Núñez C., Hancock R. E. W.: *Trends Microbiol.* 19, 419 (2011).
 15. Feldman M., Bryan R., Rajan S., Scheffler L., Brunnert S., Tang H., Prince A.: *Infect. Immun.* 66, 43 (1988).
 16. Filloux A.: *Front. Microbiol.* 2, 155 (2011).
 17. Bleves S., Viarre V., Salacha R., Michel G. P. F., Filloux A., Voulhoux R.: *Int. J. Med. Microbiol.* 300, 534 (2010).
 18. Bardoel B. W., van der Ent S., Pel M. J. C., Tommassen J., Pieterse C. M. J., van Kessel K. O. M., van Strijp J. A. G.: *PLoS Pathog.* 7, e1002206 (2011).
 19. Chaudry G. J., Holmans P. L., Clowes R. C., Draper R. K., v knize: *Genetically Engineered Toxins* (Frankel A. E., ed.), str. 405. CRC Press, New York 2019.
 20. Pollack M.: *Rev. Infect. Dis.* 5, 979 (1983).
 21. da Mata Madeira P. V., Zouhir S., Basso P., Neves D., Laubier A., Salach R., Bleves S., Faudry E., Contreras-Martel C., Dessen A.: *J. Mol. Biol.* 428, 1790 (2016).
 22. Wettstadt S., Wood T., Fecht S., Filloux A.: *Front. Microbiol.* 10, 1718 (2019).
 23. Berni B., Soscia C., Djermoun S., Lze B., Bleves S.: *Front. Microbiol.* 10, 1218 (2019).
 24. Cornelis P., Dingemans J.: *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3, 75 (2013).
 25. Ernst R. K., Hajjar A. M., Tsai J. H., Moskowitz S. M., Wilson C. B., Miller S. I.: *J. Endotoxin Res.* 9, 395 (2003).
 26. Huszczyński S. M., Lam J. S., Khursigara C. M.: *Pathogens* 9, 6 (2020).
 27. Magiorakos A. P. a 16 spoluautorů: *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 268 (2012).
 28. Bellido F., Martin N. L., Siehnel R. J., Hancock R. E. W.: *J. Bacteriol.* 174, 5196 (1992).
 29. Benz R.: *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 19, 145 (1985).
 30. Hancock R. E. W., Piers K., Brown M., Falla T., Gough M., Wu M., Fidai S., v knize: *Molecular Biology of Pseudomonas* (Nakazawa T., Furukawa K., Haas D., Silver S., ed.), str. 441. ASM Press, Washington, D.C. 1996.
 31. Delcour A. H.: *Biochim. Biophys. Acta* 1794, 808 (2009).
 32. Driffield K., Miller K., Bostock J. M., O'Neill A. J., Chopra I.: *J. Antimicrob. Chemother.* 61, 1053 (2008).
 33. Mohanty S., Baliyarsing B., Nayak S. K., v knize: *Antimicrobial Resistance: A One Health Perspective* (Mares M., Lim S. H. E., Lai K. S., ed.), kap. 3, str. 49. IntechOpen, London 2021.
 34. Gutu A. D., Rodgers N. S., Park J., Moskowitz S. M.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 5377 (2015).
 35. Olaitan A. O., Morand S., Rolain J. M.: *Front. Microbiol.* 5, 643 (2014).
 36. Zamyatina A., Hollaus R., Blaukopf M., Kosma P.: *Pure Appl. Chem.* 84, 11 (2012).
 37. Mulcahy H., Charron-Mazenod L., Lewenza S.: *PloS Pathog.* 4, e1000213 (2008).
 38. Treepong P., Kos V. N., Guyeux C., Blanc D. S., Bertrand X., Valot B., Hocquet D.: *Clin. Microbiol. Infect.* 24, 258 (2018).
- D. Maršík** (*Department of Biotechnology, University of Chemistry and Technology, Prague*): **Virulence Factors and Resistance of *Pseudomonas aeruginosa***
- One of the most feared global threats to public health today is spread and development of highly resistant bacteria, including the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. The treatment of already severe pseudomonas infections is significantly complicated by the bacterial resistance to virtually all antimicrobial drugs available on the market, including aminoglycosides, fluoroquinolones, and β -lactams, making it very difficult to eradicate compared to other pathogens. The spread of such bacterial clones is a serious risk to public health. This review aims to summarize the basic information about *Pseudomonas aeruginosa* with a focus on virulence factors and the mechanisms of resistance acquisition that bacteria use in pathogenesis.
- Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, virulence, resistance, pseudomonas infection
- Acknowledgement*
This work was supported from the grant of Specific university research – grant No. A2_FPBT_2021_029.